

β 地中海贫血的基因倍增分析与产前基因诊断

刘敬忠 高庆生 姜哲 武红 吴冠芸

(中国医学科学院基础医学研究所, 北京)

龙桂芳 梁荣

张锦 邓兵

(广西医学院附属医院)

(重庆儿科医院)

β 地中海贫血(简称 β 地贫)是我国华南和西南地区常见的一组遗传性溶血病,目前尚无满意的治疗方法。重型 β 地贫患儿病情严重,往往在幼年夭折。用现代分子生物学技术开展基因分析与产前基因诊断,避免 β 地贫基因纯合子胎儿的出生,是控制 β 地贫的有效措施。以往的基因分析是对限制性片段多态性构成的单体型进行间接连锁分析,有许多家系无法诊断。用寡核苷酸探针直接检测 β 地贫基因的突变类型,可使诊断率大大提高。但上述两种方法都是分析单拷贝基因的结构,手段繁杂,对技术和试剂要求高。需要 DNA 数量很大,成本昂贵,不具备推广的条件。基因倍增技术,又称 PCR 反应 (polymerase chain reaction),是国际上近两年刚问世的一项研究已知基因结构的新技术。其实质是体外酶促倍增单拷贝基因,使其成为超高拷贝基因,从而大大降低了研究单拷贝基因内部结构的难度,已用于核酸序列的直接分析和对突变基因的检测研究。我们采用基因倍增技术,结合寡核苷酸探针的斑点杂交法,对广西和四川的 β 地贫基因突变类型进行了分析,并开展了产前基因诊断。这一方法仅需 1 微克被测者的基因组 DNA,用低比放射活性同位素标记的寡核苷酸探针,在数日内就可完成对 β 基因中八个预期位点的检测,具有灵敏、准确、快速和经济等优点,具备推广条件。

研究表明,在中国人中造成 β 地贫的 β 珠蛋白基因内点突变已知的有八种。我们用化学法合成了用于倍增 β 基因所需的两对寡核苷酸引物和检测这八种 β 地贫突变位点的包括正常序列和突变序列的十四个寡核苷酸探针。应用

上述方法检测了广西和四川地区 25 例 β 地贫纯合子, 2 例杂合子和 2 例患儿已死亡的父母共 54 条 β 地贫染色体。基因突变类型的分布频率是: 17 密码子和 41—42 密码子两种类型突变分别占 31% 与 33%,发生频率最高;—28 位核苷酸突变占 13%,—29 位核苷酸突变与 IVS-2 中 654 位核苷酸突变各占 7%, 71—72 密码子突变只有 2%,未发现 43 位密码子和 IVS-1 中 5 位核苷酸突变。此外尚有 3 条 β 地贫染色体(6%)不属已知的八个位点突变,可能是新的突变类型。这项研究结果与国外报道的广东及海外华侨的突变类型分布频率明显不同。17 密码子的突变明显多于 IVS-2 654 位核苷酸的突变,与 41—42 密码子突变水平相当,共占总数的 64%,看来是广西和四川地区造成 β 地贫的主要分子机制。其中四川地区—29 位核苷酸突变又远比广西多。说明 β 地贫突变基因类型的分布频率在这三个地区是不同的。

在已明确 β 地贫突变类型的家系中开展产前基因诊断,可诊断率接近 100%。我们对两例四川的 β 地贫高风险胎儿进行了孕早期基因诊断,两个胎儿均排除了 β 地贫纯合子的可能性,建议继续妊娠。此外,我们还验证了一例过去用单体型连锁分析诊断有 50% 可能性是 β 地贫纯合子胎儿,但无法确诊的病例。确定为 17 密码子与 IVS-2 654 位核苷酸双重突变的 β 地贫基因纯合子。在一个 β 地贫患儿已死亡;因而无法取材的家系中,对异常基因携带者的父母已确定各自的突变类型,同样具备了开展产前基因诊断的条件。 [本文于 1988 年 4 月 15 日收到]